

РОЛЬ ЧАСТОТОЗАВИСИМОГО ОТБОРА В ЭВОЛЮЦИИ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ

Н. А. Проворов, Н. И. Воробьев

ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии, С.-Петербург

Role of frequency-dependent selection in the evolution of nodule bacteria

N. A. Provorov, N. I. Vorobyov

All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology

The mathematical model is proposed for analysing inputs of horizontal symbiotic (*sym*) gene transfer and of interstrain competition in the evolution of nodule bacteria (rhizobia). Evolution of the closed plant-microbe system is presented as a series of cycles, each cycle includes: a) *sym* gene transfer from virulent rhizobia into non-virulent soil bacteria which results in formation of virulent Novel Symbionts (NS); b) competition between initial virulent rhizobia and NS for nodule formation; c) multiplication of virulent strains *in planta* and their release into the soil; d) competition between avirulent soil bacteria and NS for saprophytic growth *ex planta*. A recurrent equation is offered to calculate the NS number at each evolutionary cycle. With the really allowed parameters of the system its evolution leads to either full forcing out of the avirulent soil bacteria by NS (when their saprophytic competitiveness is equal) or to an equilibrium between these strains (when the saprophytic competitiveness is lower in NS than in the avirulent soil bacteria). Variation of the strains in their ability to compete for the host nodulation may lead to a frequency-dependent selection of rare genotypes in the rhizobia population. This selection increases not only the heterogeneity of the rhizobia population but also their panmixia because the rare recombinants can be multiplied in the nodules. This may lead to a broad expansion of the *sym* genes in soil bacterial communities which probably caused a high taxonomic diversity of rhizobia.

Клубеньковые бактерии (ризобии) — азотфиксирующие симбионты бобовых растений — уникальная модель для разработки ряда направлений генетики, в первую очередь симбиогенетики, экологической и популяционной генетики. Ризобии (роды *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*) — это факультативные симбионты, и их популяции заселяют разные экологические ниши: почву (где они существуют как сапротрофы) и внутреннюю среду растений-хозяев (где они существуют как биотрофы). Чтобы занять эти ниши, ризобияльные штаммы вступают в сложные взаимодействия между собой, с другими почвенными микробами, а также с растениями-хозяевами. Эти взаимодействия являются объектом интенсивного молекулярно-генетического анализа, и уже выявлен ряд генных систем, контролирующих развитие симбиоза (*sym*-гены), а также адаптацию ризобий к некоторым почвенно-экологическим факторам. Показано, что высокая пластичность системы *sym*-генов (рекомбинационные перестройки, перенос генов между разными штаммами) играет важную роль в эволюции симбиотических признаков ризобий [33, 37]. Однако популяционные механизмы их эволюции, в частности селективные процессы, обуславливающие изменения организации *sym*-генов, остаются малоизученными.

Динамическая структура ризобияльных популяций

Природные популяции ризобий характеризуются динамической структурой, что вы-
ражается в их высокой генетической гетерогенности и панмиктичности.

Генетическая гетерогенность. Путем анализа изоферментного состава было показа-
но, что популяции ризобий более полиморфны, чем популяции других бактерий. Значение
индекса гетерогенности [29], вычисляемого по формуле $H = (1 - \sum p_i^2) \cdot n / (n - 1)$
(p_i — частота встречаемости i -го генотипа, n — объем выборки штаммов), для ризоби-
альных популяций составляет 0,46–0,93, тогда как для энтеробактерий 0,21–0,52, а для
бактериальных патогенов животных и человека 0,28–0,74.

Очень широким размахом характеризуется изменчивость ризобий по признакам сим-
биоза. Штаммы, принадлежащие к одному виду и выделенные из одного образца почвы,
могут существенно различаться по вирулентности (количество, размер, скорость образова-
ния клубеньков), азотфиксирующей активности и даже по хозяйской специфичности
(спектр растительных генотипов, с которыми возможно образование симбиоза). Более то-
го, применение полуселективных методов выделения ризобий из почвы показало, что
штаммы, способные к симбиозу, представляют лишь верхушку “популяционного айсбер-
га”, а в почвах часто преобладают штаммы, лишенные вирулентности. Так, у ризобий фа-
соли (*R. etli*), обитающих в почвах Мексики, “спрятанная” (состоящая из неvirulentных
штаммов) часть популяции составляет более 90% от ее общей численности [35].

Многие данные указывают на то, что именно взаимодействие с растением-хозяином
— основная причина высокой изменчивости ризобияльных популяций. Это взаимодейст-
вие обуславливает формирование многочисленных ризобияльных популяций и является
основной предпосылкой возникновения их генетического разнообразия [1, 22, 39]. Наибо-
лее полиморфные популяции ризобий обитают в центрах происхождения соответствующих
растений-хозяев, где наблюдается “параллельное варьирование” симбиотических партне-
ров [4]. У ризобий гороха (*R. leguminosarum* bv. *viciae*) индекс гетерогенности по изофер-
ментному спектру составил: для штаммов, выделенных непосредственно из почвы, 0,46, а
для штаммов, выделенных из клубеньков, образовавшихся при выращивании гороха в той
же почве, 0,57–0,59 [43]. Длительное хранение почвы без растения-хозяина резко снижает
генетическое разнообразие популяции ризобий люцерны [24].

Панмиктичность. Высокая панмиктичность ризобияльных популяций выражается в
большом вкладе рекомбинантных генотипов в их структуру. Она была показана путем ана-
лиза “неравновесия по сцеплению” (linkage disequilibrium) изоферментных маркеров, а
также разных аллелей хромосомных и плазмидных генов. Установлено, что в популяциях
ризобий фасоли и козлятника 16–30% штаммов являлись в недавнем прошлом донорами
или реципиентами плазмид [41].

Наибольшая панмиктичность (отсутствие “неравновесия по сцеплению”) выявляется
при анализе популяций, состоящих из генетически родственных штаммов [20, 28], что мо-
жет быть связано как с высокой частотой переноса между ними генов, так и с высокой ста-
бильностью возникающих рекомбинантов. Однако перенос генов возможен и между отда-
ленными формами ризобий, а рекомбинанты, способные формировать клубеньки на кор-
нях бобовых, удавалось получать при переносе *sym*-генов даже в такие неродственные ри-
зобиям бактерии, как *Escherichia*, *Lignobacter*, *Pseudomonas*, *Sphingobacterium* [18, 21, 31].

Многие данные указывают на то, что высокая панмиктичность ризобияльных популя-
ций является результатом их взаимодействия с растениями-хозяевами. Это доказывается
тем, что: а) “неравновесие по сцеплению” (которое говорит о малой панмиктичности попу-
ляции) характерно для штаммов ризобий *R. etli*, выделенных из разных растений, но не

проявляется у штаммов, выделенных из одного и того же растения [36]; б) в популяциях *R. leguminosarum* комбинирование хромосомных маркеров с “симбиотическими” плазмидами значительно ближе к случайному, чем комбинирование с “несимбиотическими” плазмидами [26].

Не вызывает сомнений, что динамическая структура популяций в значительной степени связана с высокой пластичностью ризобияльного генома, который содержит необычайно большое (для прокариот) число повторяющихся последовательностей ДНК и IS-элементов. У многих штаммов выявлены так называемые “ампликоны” и “симбиотические островки” — достаточно протяженные участки генома (60–500 тыс. п. н.), фланкированные повторами ДНК, которые могут с высокой частотой менять свою копийность, локализацию в геноме, а также переноситься между разными штаммами [27, 30, 37]. Важно отметить, что наибольшая пластичность характерна для участков ризобияльного генома, которые содержат “симбиотические” гены.

Эти факты могут в значительной степени объяснить высокий полиморфизм ризобияльных популяций, однако явно недостаточны для объяснения их высокой панмиктичности. Парадоксальность ситуации заключается в том, что клубеньковые бактерии лишены собственных эффективных систем переноса генов. У некоторых штаммов выявлены конъюгативные плазмиды, однако они переносятся с низкой частотой (не более 10^{-5} – 10^{-6} на реципиент) и лишь в редких случаях осуществляют мобилизацию других репликонов. Эффективные системы переноса генов (F, R-факторы) есть у энтеробактерий, но их популяции почти всегда имеют клональную структуру [28]. Разрешить этот парадокс можно, если предположить, что в ризобияльных популяциях, взаимодействующих с растениями, действуют селективные механизмы, которые обеспечивают преимущественное размножение редко возникающих рекомбинантных клонов.

Размножение редких генотипов в ризобияльной популяции, взаимодействующей с растением-хозяином

К настоящему времени накоплено много данных о динамике отдельных генетических процессов (возникновение мутантов, перенос генов, действие факторов отбора) в популяциях ризобий. Однако создание экспериментальных систем, в которых возможно одновременное изучение всего комплекса этих процессов, необходимое для построения целостной картины микроэволюции ризобий, не представляется возможным. Такая картина может быть получена в результате математического моделирования наиболее важных генетических процессов, определяющих популяционную динамику ризобий, а именно переноса *sym*-генов и действия факторов отбора.

Отбор в ризобияльных популяциях осуществляется в ходе межштаммовой конкуренции, которая происходит в двух основных формах: сапрофитная конкуренция (за колонизацию почвы) и нодуляционная конкуренция (за образование клубеньков). Мы [5, 6] создали модель микроэволюционных процессов в простейшей микробно-растительной системе. Эта система включает следующие компоненты (рис. 1, А): симбиотически активный штамм, который способен формировать у растений клубеньки (исходный симбионт, или ИС); симбиотически неактивный штамм, который не формирует клубеньков, однако может приобретать эту способность после переноса *sym*-генов из ИС (это может быть либо авирулентный штамм ризобий, либо сапрофитная почвенная бактерия; назовем его авирулентной местной бактерией, или АМБ). Симбиотически активные бактерии, возникающие в результате переноса *sym*-генов из ИС в АМБ, назовем новым симбионтом (НС). Кроме то-

в систему входит растение-хозяин, которое инокулируется вирулентными штаммами ИС и НС. Важно отметить, что ИС и АМБ составляют единую популяцию изогенных мезофильных бактерий (МБ), численность которых постоянна. Эта популяция и есть эволюционирующая часть системы.

Мы предположили, что микроэволюция системы носит циклический характер, который отражает жизненные циклы растения-хозяина (рис. 1, Б). При этом считаем, что система замкнутая и ее основные параметры либо не меняются от цикла к циклу (общее число бактерий, число бактерий, выходящих в почву из каждого клубенька; частота переноса ИС в МБ), либо после окончания каждого цикла возвращаются к исходному уровню (численности ИС и МБ).

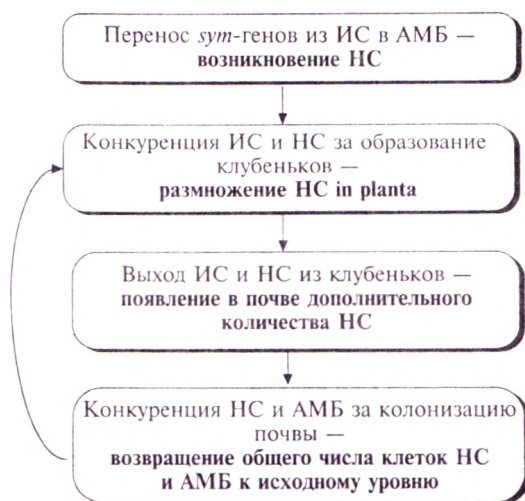
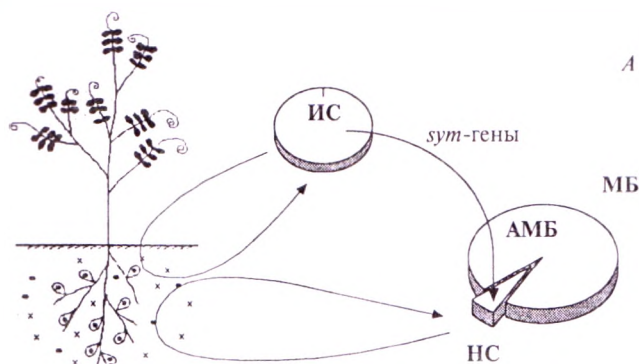


Рис. 1. Модель циклических микроэволюционных процессов в системе "бактерии-растение-почва" [5]:

А — основные компоненты моделируемой системы; Б — последовательность событий в микроэволюционном цикле

Существенным в модели является то, что в присутствии растения-хозяина конкурентная борьба в ризобияльных популяциях резко усиливается, так как вступает в действие фактор конкуренции между штаммами за образование клубеньков, а также обостряется

сапрофитная конкуренция между штаммами, находящимися в почве и освобождаемыми в нее при отмирании клубеньков. Для того, чтобы проанализировать селективное действие каждого из этих типов конкуренции мы предположили, что они осуществляются между разными штаммами: сапрофитная конкуренция — между НС и АМБ, а нодуляционная конкуренция — между НС и ИС.

Важно отметить, что все основные события, включенные в нашу модель, достаточно подробно изучены в лабораторных или полевых опытах, и поэтому мы имеем возможность моделировать популяционные процессы, приближенные к природным процессам. Оказалось, что при реально допустимых значениях параметров системы ее эволюция, как правило, заканчивается тем, что НС полностью вытесняет АМБ (рис. 2). К такому результату система приходит в том случае, когда НС по нодуляционной конкурентоспособности равны ИС, а по сапрофитной конкурентоспособности равны АМБ. Если же конкурентоспособность штаммов разная, то исход эволюции системы может быть иным.

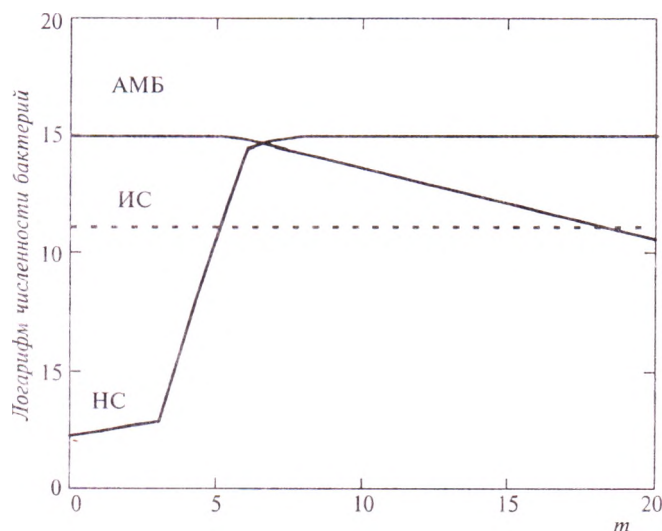


Рис. 2. Вытеснение новыми симбионтами (НС) авирулентных местных бактерий (АМБ) при их равной сапрофитной конкурентоспособности [5]

Так, различия НС и АМБ по сапрофитной конкурентоспособности могут обуславливать формирование полиморфных популяций, и в частности — поддержание в них большого количества симбиотически неактивных штаммов (рис. 3). Высокая выживаемость (скорость размножения) АМБ может быть связана с отсутствием *sum*-генов, не нужных для сапрофитного роста. Такое допущение вполне оправдано, так как присутствие генов, не нужных для сапрофитного роста бактерий, обычно снижает его скорость [7, 14]. Имеются многочисленные данные о том, что симбиотически активные штаммы ризобий уступают по сапрофитной конкурентоспособности неактивным штаммам [33].

Еще большую роль в формировании структуры ризобияльной популяции играет конкуренция за образование клубеньков. Эмпирически было показано [9], что конкуренция между двумя вирулентными штаммами (1 и 2), может быть описана уравнением

$$K_1/K_2 = c (N_1/N_2)^a,$$

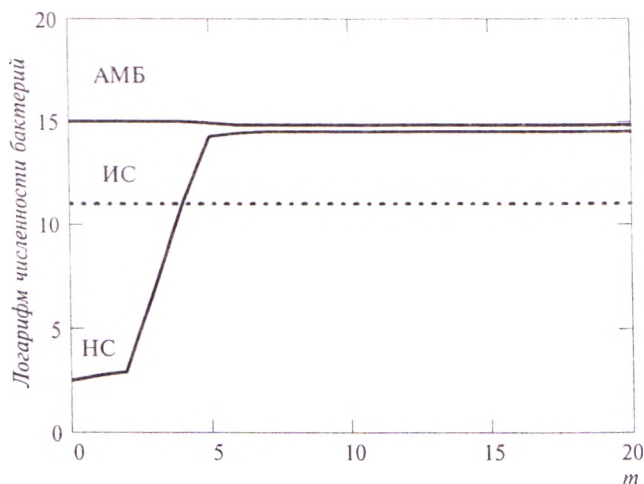


Рис. 3. Установление равновесия между новыми симбионтами (НС) и авирулентными местными бактериями (АМБ) при сниженной сапрофитной конкурентоспособности НС [6]

K_1 и K_2 — количества клубеньков, содержащих штаммы 1 и 2; N_1 и N_2 — количества штаммов в инокулюме; a и c — постоянные (безразмерные) параметры.

Анализ различных бобово-ризобияльных систем показал, что параметр c может быть больше, так и меньше 1, а параметр a всегда меньше 1 [9, 11, 19, 25, 40]. Нетрудно видеть, что если $N_1 < N_2$, то при "типичных" значениях параметров ($a < 1$; $c = 1$) выполняется

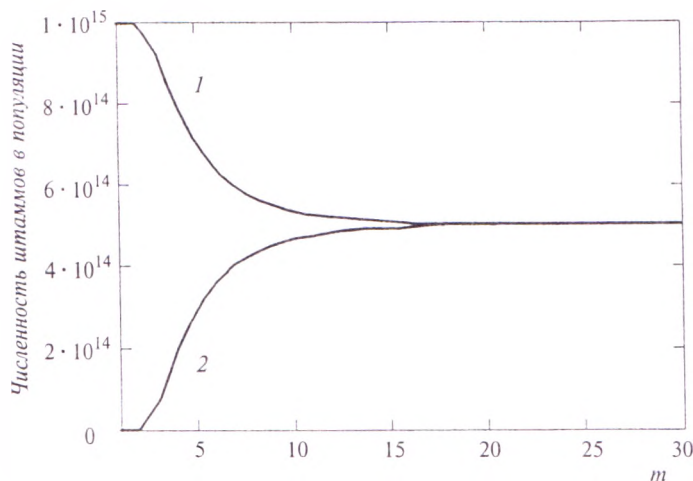


Рис. 4. Размножение редкого (2) вирулентного штамма в популяции клубеньковых бактерий в процессе конкуренции с доминирующим (1) штаммом за образование клубеньков [6]

сравнение $K_1/K_2 > N_1/N_2$, т. е. возможность преимущественного размножения *in planta* получают штаммы, редко встречающиеся в почве. Например, штамм, составляющий всего

10^{-5} от численности популяции, при величине $a=0,2$ будет формировать 10% клубеньков. Если мы учтем эту зависимость в нашей модели, то возникает картина выравнивания численностей доминирующего и редкого штаммов в ризобияльной популяции, взаимодействующей с растением (рис. 4).

Роль частотозависимого отбора в микро- и макроэволюции ризобий

Таким образом, результатом межштаммовой конкуренции, происходящей в ризобияльной популяции при взаимодействии с хозяином, является размножение редко встречающихся генотипов, т. е. их частотозависимый отбор (frequency dependent selection). Эта форма отбора широко распространена в природе: она обеспечивает селективные преимущества редких генотипов даже в тех случаях, когда они не обладают повышенной скоростью размножения, что способствует поддержанию полиморфизма популяций [3].

Действие частотозависимого отбора в популяциях ризобий может иметь важные последствия как для микроэволюции, так и для макроэволюции этих бактерий. Наиболее явным его результатом является повышение гетерогенности ризобияльных популяций при взаимодействии с растениями-хозяевами, что было эмпирически показано в ряде работ [1, 22, 43]. Однако микроэволюционные последствия частотозависимого отбора могут быть и более широкими. Действительно, редкими генотипами, которые в результате взаимодействия бактерий с растением размножаются в популяции, могут быть:

- штаммы “дикого типа”, выживаемость которых в почве низка (из-за чувствительности к действию неблагоприятных абиотических факторов);
- мутанты штаммов “дикого типа”;
- рекомбинанты, возникающие при переносе *sum*-генов между вирулентными штаммами ризобий или же из ризобий в неродственные им бактерии.

Таким образом, частотозависимый отбор может обусловить не только высокий полиморфизм ризобияльных популяций, но и их высокую панмиктичность. Последняя может быть результатом того, что редко образующиеся рекомбинанты получают возможность размножения в популяции бактерий, взаимодействующих с растениями. Связь высокой панмиктичности с симбиотической стадией жизненного цикла прослеживается для широкого круга микроорганизмов. Так, для болезнетворных энтеробактерий (*Escherichia*, *Salmonella*) показана высокая интенсивность переноса генов, контролирующих патогенные свойства [10, 15], хотя популяционная структура, определяемая путем анализа изоферментных маркеров, у этих микробов является строго клональной [28]. Свободное комбинирование различных аллелей *rbcLX* и 16S рРНК было выявлено у цианобактерий *Nostoc*, для которых весьма характерно вступление в симбиоз с наземными растениями, но не выявлено для других цианобактерий (*Microcystis*, *Planktotrix*, *Tychonema*), не вступающих в симбиоз [34].

Нам представляется, что частотозависимый отбор играет важную роль не только в формировании популяционной структуры, но и в макроэволюции ризобий. Он может быть причиной широкой экспансии *sum*-генов в природных бактериальных сообществах, которая, по всей видимости, привела к формированию огромного таксономического разнообразия ризобий. Дело в том, что ризобии — это полифилетичные по происхождению бактерии. Анализ генов 16S рРНК показал, что их основные группы (роды *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*) дивергировали от гипотетического “общего предка” задолго до появления бобовых растений-хозяев [44]. В то же время выявлен ряд

симбиотических (*sym*) генов, структурно гомологичных и функционально взаимозаменяемых для всех форм ризобий (это "общие" гены вирулентности, которые кодируют сигналы поровой части Nod-фактора, а также ряд генов, контролирующих синтез поверхностных структур и регуляцию симбиотической азотфиксации). У свободноживущих бактерий такие гены отсутствуют. Поэтому наличие "общих" *sym*-генов у неродственных форм ризобий не может быть объяснено иначе как тем, что эти гены, первоначально возникнув у одной формы ризобий, переносились между разными бактериями в процессе их контактов с растениями-хозяевами.

Важно отметить, описанный механизм опосредованного хозяином повышения популяционной изменчивости симбиотических бактерий является далеко не единственным. На рисунке показана стимуляция растением переноса генов между штаммами ризобий, находящимися в ризосфере или в клубеньках [8, 17, 32]. Пребывание в организме хозяина является мутагенным фактором для целого ряда эндосимбиотических микробов. Это было теоретически предсказано М. Кимурой более 30 лет назад [23], затем экспериментально показано для ряда патогенов животных и растений [12, 16, 38]; предварительные данные имеются и для ризобий [2, 42].

Частотозависимый отбор в ризобияльных популяциях имеет и существенное практическое значение. Во-первых, он может быть использован для выявления высокоактивных штаммов, встречаемость которых в популяциях низка. Для поиска таких штаммов обычно используют популяции ризобий, выделяемых из клубеньков, причем встречаемость высокоактивных штаммов может возрастать при использовании специальных "растений-ловушек", способных направленно отбирать их из гетерогенной почвенной популяции [4]. Во-вторых, действие частотозависимого отбора должно учитываться при использовании инженерных штаммов ризобий, так как рекомбинанты, которые могут возникать при взаимодействии этих штаммов с аборигенной микрофлорой, в определенных условиях способны быстро размножаться в микробно-растительных системах.

Известно, что частотозависимый отбор осуществляется при различных межорганизменных взаимодействиях в системах "паразит-хозяин", "хищник-жертва", а также при внутривидовой конкуренции за питательные субстраты или за полового партнера [3]. В паразитарных системах эта форма отбора обуславливает повышение частот редко встречающихся аллелей устойчивости (у хозяина) и вирулентности (у паразита), что вызывает генетические изменения генетической структуры системы "паразит-хозяин". При условии постоянного контроля признаков устойчивости и вирулентности такие изменения обеспечивают постоянный отбор в пользу рекомбинантных генотипов [13], что, по-видимому, является важным фактором, обуславливающим высокую интенсивность половых процессов в популяциях паразитических организмов, т.е. их высокую панмиктичность.

Таким образом, действие частотозависимого отбора в ризобияльных популяциях — частный случай важного эколого-генетического феномена — повышения популяционного разнообразия микробов, вступающих в симбиоз с высшими организмами. К настоящему времени накоплено много данных в пользу того, что взаимодействия с хозяевами обуславливают высокую мутационную и рекомбинационную изменчивость, а также селективные действия, которые определяют чрезвычайно динамичную структуру популяций микробионтов. Эти процессы обеспечивают повышение полиморфизма и панмиктичности микробных популяций, интенсифицируют происходящие в них процессы отбора и, как следствие, стимулируют эволюцию симбиотических систем.

УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Доросинский Л. М. Вопросы экологии клубеньковых бактерий // Усп. микробиол. 1975. Т. 10. С. 201-213.
2. Красильников Н. А., Мелкумова Т. А. Изменчивость клубеньковых бактерий внутри бобовых растений // Изв. АН СССР. 1963. № 5. С. 693-706.
3. Лучикова Е. М. Роль частотозависимого отбора в микроэволюции и экологические предпосылки его возникновения // Проблемы новейшей истории эволюционного учения. Л., 1981. С. 95-114.
4. Проворов Н. А. Перспективы использования популяций некоторых видов семейства Fabaceae в селекции на повышение интенсивности симбиотической азотфиксации // Раст. ресурсы. 1996. Т. 32, вып. 3. С. 124-134.
5. Проворов Н. А., Воробьев Н. И. Популяционная генетика клубеньковых бактерий: моделирование циклических процессов в микробно-растительных системах // Генетика. 1998. Т. 34, № 12. С. 1704-1711.
6. Проворов Н. А., Воробьев Н. И. Роль межштаммовой конкуренции в эволюции генетически полиморфных популяций клубеньковых бактерий // Генетика. 1998. Т. 34, № 12. С. 1712-1719.
7. Хмель И. А. Плазмиды и эволюция микроорганизмов // Усп. совр. биологии. 1985. Т. 99, вып. 3. С. 323-337.
8. Чернова Т. А., Арономан А. А., Сударов Б. В. Изучение генетической природы неvirulentных мутантов CXM1-125 и CXM1-126 *Rhizobium meliloti* // Генетика. 1986. Т. 22, № 8. С. 2066-2073.
9. Amarger N., Lobreau J. P. Quantitative study of nodulation competitiveness in *Rhizobium* strains // Appl. Envir. Microbiol. 1982. Vol. 44. P. 583-588.
10. Baumber A. J., Gilde A. J., Tsolis R. M., van der Velden A. W. M., Ahmer B. M. M., Heffron F. Contribution of horizontal gene transfer and deletion events to development of distinctive patterns of fimbrial operons during evolution of *Salmonella* serotypes // J. Bacteriol. 1997. Vol. 179. P. 317-322.
11. Beattie C. A., Clayton M. K., Handelsman J. Quantitative comparison of the laboratory and field competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* // Appl. Envir. Microbiol. 1989. Vol. 55. P. 2755-2761.
12. Belanger C., Canfield M. L., Moore L. W., Dion P. Genetic analysis of non-pathogenic *Agrobacterium tumefaciens* mutants arising in crown gall tumors // J. Bacteriol. 1995. Vol. 177. P. 3752-3757.
13. Bell G., Maynard Smith J. Short-term selection for recombination among mutually antagonistic species // Nature. 1987. Vol. 328, № 6125. P. 66-68.
14. Bennett P. M., Linton A. H. Do plasmids influence the survival of bacteria? // J. Antimicrob. Chemother. 1986. Vol. 18. P. 123-126.
15. Boyd E. F., Hartl D. L. Chromosomal regions specific to pathogenic isolates of *Escherichia coli* have a phylogenetically clustered distribution // J. Bacteriol. 1998. Vol. 180, № 5. P. 1159-1165.
16. Bridges B. A. Hypermutation under stress // Nature. 1997. Vol. 387, № 6633. P. 557-558.
17. Broughton W. J., Samrey U., Stanley J. Ecological genetics of *Rhizobium meliloti*: symbiotic plasmid transfer in the *Medicago sativa* rhizosphere // FEMS Microbiol. Lett. 1987. Vol. 40. P. 251-255.
18. Fenton M., Jarvis B. D. W. Expression of the symbiotic plasmid from *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* in *Sphingobacterium multivorum* // Canad. J. Microbiol. 1994. Vol. 40. P. 873-879.
19. Franco A. A., Vincent J. M. Competition amongst rhizobial strains for the colonization and nodulation of two tropical legumes // Plant and Soil. 1976. Vol. 45, № 1. P. 27-48.
20. Gordon D. M., Wexler M., Reardon T. B., Murphy P. J. The genetic structure of *Rhizobium* populations // Soil Biol. Biochem. 1995. Vol. 27. P. 491-499.
21. Hirsch A. M., Wilson K. J., Jones J. D. G., Bang M., Walker V. V., Ausubel F. M. *Rhizobium meliloti* nodulation genes allow *Agrobacterium tumefaciens* and *Escherichia coli* to form pseudonodules on alfalfa // J. Bacteriol. 1984. Vol. 158. P. 1133-1143.
22. Hirsch P. R. Population dynamics of indigenous and genetically modified rhizobia in the field // New Phytol. 1996. Vol. 133. P. 159-171.
23. Kimura M. On the evolutionary adjustment of spontaneous mutation rates // Genet. Res. 1967. Vol. 9. P. 23-34.
24. Koster B., Puhler A., Simon R. Monitoring and diversity of *Rhizobium meliloti* field and microcosm isolates with a novel rapid genotyping method using insertion elements // Molec. Ecol. 1993. Vol. 2. P. 35-46.
25. Labandera C. A., Vincent J. M. Competition between an introduced strain and native Uruguayan strains of *Rhizobium trifolii* // Plant and Soil. 1975. Vol. 42. P. 327-347.
26. Laguerre G., Mazurier S. I., Amarger N. Plasmid profiles and restriction length polymorphism of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in field populations // FEMS Microbiol. Ecol. 1992. Vol. 101. P. 17-26.

27. Mavingui P., Laeremans T., Flores M., Romero D., Martinez-Romero E., Palacios R. Genes essential for Nod factor production and nodulation are located on a symbiotic amplicon (AMPRtrCFN299pc60) in *Rhizobium tropici* // J. Bacteriol. 1998. Vol. 180. № 11. P. 2866–2874.
28. Maynard Smith J., Smith N. H., O'Rourke M., Spratt B. G. How clonal are bacteria? // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. Vol. 90. P. 4384–4388.
29. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals // Genetics. 1978. Vol. 89. P. 583–590.
30. Palacios R., Castillo M., Flores M., Hernandez G., Mavingui P., Romero D. Dynamics of the *Rhizobium* genome // Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications / I. A. Tikhonovich, N. A. Provorov, V. I. Romanov and M. E. Newton, eds. Kluwer, Dordrecht, 1995. P. 353–358.
31. Plicinski J., Rolfe B. G. Sym plasmid genes of *Rhizobium trifolii* expressed in *Lignobacter* and *Pseudomonas* strains // J. Bacteriol. 1985. Vol. 162. P. 1261–1269.
32. Prestorius-Guth I. M., Puhler A., Simon R. Conjugal transfer of megaplasmid 2 between *Rhizobium meliloti* strains in alfalfa nodules // Appl. Envir. Microbiol. 1990. Vol. 56. P. 2354–2359.
33. Prestorov N. A. Coevolution of rhizobia with legumes: facts and hypotheses // Symbiosis. 1998. Vol. 24. № 3. P. 357–367.
34. Rudi K., Skulberg O. M., Jakobsen K. S. Evolution of cyanobacteria by exchange of genetic material among phylogenetically related strains // J. Bacteriol. 1998. Vol. 180. № 13. P. 3453–3461.
35. Segovia L., Pinero D., Palacios R., Martinez-Romero E. Genetic structure of a soil population of non-symbiotic *Rhizobium leguminosarum* // Appl. Envir. Microbiol. 1991. Vol. 57. P. 426–433.
36. Souza V., Nguyen T. T., Hudson R. R., Pinero D., Lenski R. E. Hierarchical analysis of linkage disequilibrium in *Rhizobium* populations: evidence for sex? // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. Vol. 89. P. 8389–8393.
37. Sullivan J. T., Ronson C. W. Evolution of rhizobia by acquisition of 500-kb symbiosis island that integrates *plac-6RNA* gene // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. Vol. 95. № 9. P. 5145–5149.
38. Taddel F., Radman M., Maynard Smith J., Toupance B., Goyon P. H., Godelle B. Role of mutator alleles in adaptive evolution // Nature. 1997. Vol. 387. P. 700–702.
39. Thompson J. A. Selection of *Rhizobium* strains // Nitrogen Fixation in Mediterranean Agriculture / Eds. D. G. Materon L. A. Dordrecht; Boston; Lancaster: Kluwer Acad. Publ. 1988. P. 207–223.
40. Vargas A. A. T., Graham P. H. Cultivar and pH effects on competition for nodule sites between isolates of *Rhizobium* in beans // Plant and Soil. 1989. Vol. 117. P. 195–200.
41. Vlasses A. M., Pinero D. 1992. Phylogenetic estimation of plasmid exchange in bacteria // Evolution. Vol. 46. № 3. P. 641–656.
42. Weaver R. W., Wright S. F. Variability in effectiveness of rhizobia during culture and in nodules // Appl. Envir. Microbiol. 1987. Vol. 53. P. 2972–2974.
43. Young J. P. W., Demetriou L., Apte R. G. *Rhizobium* population genetics: enzyme polymorphism in *Rhizobium leguminosarum* from plants and soil in a pea crop // Appl. Envir. Microbiol. 1987. Vol. 53. P. 397–402.
44. Young J. P. W., Haukka K. E. Diversity and phylogeny of rhizobia // New Phytol. 1996. Vol. 133. P. 87–94.